

## **EFEITO DE CHALCONAS SINTÉTICAS NA ATIVIDADE DA ENZIMA NTPDASE EM LINFÓCITOS DE RATOS**

**DEBOM, Gabriela<sup>1</sup>; SILVEIRA, Elita<sup>2</sup>; TEIXEIRA, Fernanda<sup>2</sup>; RITTER, Marina<sup>2</sup>; PEREIRA, Claudio<sup>3</sup>; BRAGANHOL, Elizandra<sup>3</sup>, SPANEVELLO, Roselia<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduanda – Curso de Biotecnologia/CDTEC-UFPeI;

<sup>2</sup>Pós-Graduanda, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção/CCQFA-UFPeI

<sup>3</sup>Professor no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos/CCQFA – UFPeI

<sup>4</sup>Professor no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos/CCQFA – UFPeI/

Orientador do trabalho. gabriela.debom@gmail.com

### **1 INTRODUÇÃO**

Os nucleotídeos de adenina ATP e ADP e o nucleosídeo correspondente adenosina são importantes moléculas envolvidas na regulação da resposta imune e inflamatória (BOURS et al., 2006). O ATP possui funções pró-inflamatórias como a estimulação e a proliferação de linfócitos, sendo essencial para a liberação de citocinas como a interleucina 2 (IL-2) e o interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (BOURS et al., 2006).

A sinalização induzida pelo ATP extracelular correlaciona-se diretamente com a atividade da NTPDase, enzima responsável pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados, incluindo ATP e ADP, levando a formação de nucleotídeos monofosfatados (ZIMMERMANN et al., 2007). Tendo em vista que a atividade desta enzima encontra-se alterada em linfócitos em diversas condições patológicas, sugere-se a sua avaliação como possível indicador de alterações imunológicas, bem como um importante alvo para estudos de compostos com potencial ação imunomoduladora.

O termo chalcona caracteriza uma família de compostos possuindo como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou de um grupo hidroxila (DIMMOCK et al., 1999). As chalconas são precursoras na via biossintética dos flavonóides. São encontradas na pigmentação amarela de vegetais, já que constituem o núcleo central de uma variedade de compostos biológicos importantes obtidos a partir de plantas (DIMMOCK et al., 1999).

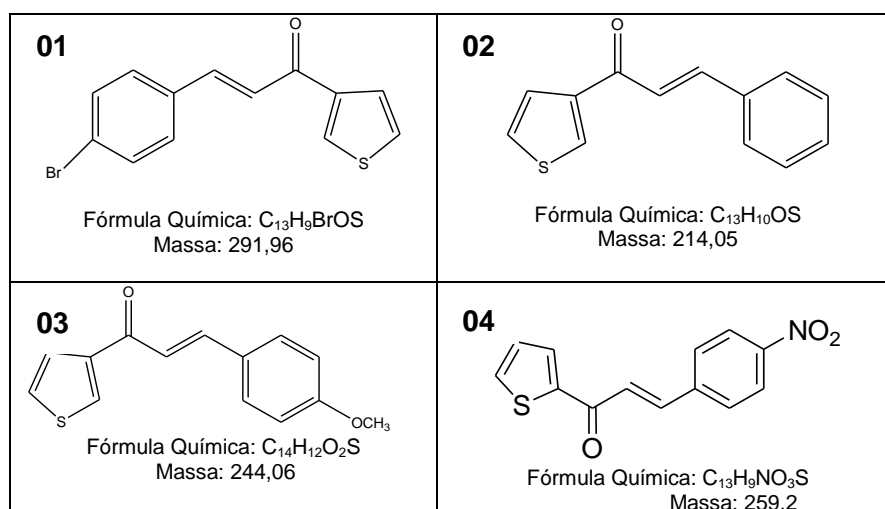
As chalconas apresentam um grande potencial terapêutico uma vez que vários estudos têm demonstrado que estas moléculas possuem propriedades analgésicas, antioxidantes, antibacterianas, antitumorais, antiinflamatórias e imunossupressoras (LEBEAU et al., 2000).

Sendo assim, considerando a importância da enzima NTPDase em processos inflamatórios e imunes, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes chalconas na atividade dessa enzima em linfócitos de ratos, permitindo assim a possível identificação de compostos potencialmente úteis na terapêutica de doenças inflamatórias agudas e crônicas.

### **2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)**

#### **2.1 Obtenção das chalconas**

Os derivados sintéticos das chalconas foram sintetizados na Universidade Federal de Pelotas. As chalconas avaliadas nesse estudo foram as seguintes:



## 2.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Pelotas, mantidos em ambiente com temperatura (20 –24°C) e umidade (40 – 60%) controladas, água e alimento *ad libitum* e ciclos claro-escuro.

Os animais foram previamente anestesiados e submetidos à eutanásia. Amostras de sangue total foram coletadas por punção cardíaca e os linfócitos foram separados para a dosagem da atividade da NTPDase.

## 2.3 Determinação do efeito in vitro das chalconas na atividade da NTPDase

Os linfócitos foram isolados do sangue periférico coletado com EDTA através de um gradiente de densidade (Ficoll-Histopaque). Após a separação dos linfócitos a atividade enzimática da NTPDase foi determinada através da quantificação do fosfato inorgânico liberado na reação (LEAL et al., 2005). As chalconas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) e introduzidas no ensaio enzimático nas concentrações finais de 50, 100 e 200 µM.

## 2.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o teste Post-Hoc de Duncan ao nível mínimo de 95% de significância (P< 0,05).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados, in vitro, demonstraram que a chalcona 01 na concentração de 100 e 200 µM aumentou atividade NTPDase em linfócitos de ratos para os dois substratos utilizados (ATP e ADP) (P<0,05) (Tabela 1 e 2). As chalconas 02 e 04 diminuíram a atividade da NTPDase em linfócitos em todas as concentrações avaliadas (50, 100 e 200 µM) quando ATP foi usado como substrato (P<0,05)

(Tabela 1). A chalcona 03 também diminuiu a hidrólise do ATP, entretanto esse efeito foi observado somente na maior concentração avaliada (200 µM) quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1).

Em relação à hidrólise do ADP, os resultados demonstraram que as chalconas 02 e 03 causaram uma diminuição na atividade da enzima na concentração de 200 µM, enquanto que a chalcona 04 não teve efeito na hidrólise do ADP quando comparado ao grupo controle (Tabela 2). Para excluir a interferência do solvente na atividade da enzima, o DMSO também foi testado, e o resultados demonstraram que este composto não altera a atividade da NTPDase em linfócitos (Tabela 1 e 2).

**Tabela 1:** Efeito in vitro das chalconas na atividade da NTPDase de linfócitos usando ATP como substrato.

<i>Atividade da NTPDase (Hidrólise ATP)</i>				
<i>Grupos</i>	<i>Chalcona 01</i>	<i>Chalcona 02</i>	<i>Chalcona 03</i>	<i>Chalcona 04</i>
<b>Controle</b>	107,74±6,18	107,54±6,1	140,82 ± 6,2	108,06 ± 4,4
<b>DMSO</b>	114,05±8,7	114,05±8,7	158,76±10,4	106,56±10,5
<b>50µM</b>	121,77±10,4	52,80±1,67*	147,17 ± 10,5	76,89 ± 3,1*
<b>100µM</b>	158,28±14,9*	49,17±7,95*	160,36 ± 12,5	75,23 ± 0,8*
<b>200µM</b>	149,48±18,4*	38,84±8,21*	96,17 ± 9,3*	61,14 ± 7,1*

\*Diferente do controle ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 2:** Efeito in vitro das chalconas na atividade da NTPDase de linfócitos usando ADP como substrato.

<i>Atividade da NTPDase (Hidrólise ADP)</i>				
<i>Grupos</i>	<i>Chalcona 01</i>	<i>Chalcona 02</i>	<i>Chalcona 03</i>	<i>Chalcona 04</i>
<b>Controle</b>	48,24±6,21	48,24±6,21	156,58 ± 5,6	94,05 ± 12,2
<b>DMSO</b>	55,35±2,5	55,35±2,5	148,45±5,4	91,27±0,7
<b>50µM</b>	42,70±10,9	58,09±9,9	141,34 ± 22,2	96,60 ± 3,6
<b>100µM</b>	125,25±10,1*	54,63±6,2	111,94 ± 12	87,47 ± 5,6
<b>200µM</b>	127,95±27,7*	38,84±8,21*	96,31 ± 11,2*	81,01 ± 8,8

\*Diferente do controle ( $P < 0,05$ ).

A enzima NTPDase hidrolisa tanto o nucleotídeo ATP quanto o nucleotídeo ADP. Considerando que o ATP extracelular possui funções pró-inflamatórias, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o aumento da atividade da NTPDase causado pela chalcona 01 poderia ser importante em diminuir os níveis de ATP extracelular. Sendo assim, pode-se propor que as alterações na atividade da NTPDase causada por este composto poderia contribuir para diminuir a resposta

inflamatória e imune e explicar ao menos em parte a atividade antiinflamatória descrita para estes compostos. Por outro lado, as chalconas 02, 03, 04 inibiram a atividade da NTPDase em linfócitos, esse efeito poderia levar um aumento nos níveis de ATP extracelular contribuindo para a exarcebação de uma resposta imune e inflamatória.

#### 4 CONCLUSÃO

Esses resultados permitem concluir que as chalconas interferem in vitro na sinalização purinérgica em linfócitos de ratos. Os diferentes efeitos das chalconas na atividade da NTPDase de linfócitos pode ser atribuído em parte à estrutura química de cada uma delas. Os resultados obtidos para a chalcona 01 podem ser importantes na busca de terapias que possam beneficiar pacientes com alterações na resposta imune e inflamatória. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar um possível potencial terapêutico desses compostos relacionado com a sinalização induzida pelo ATP.

Apoio financeiro: PIBIC/CNPq

#### 5 REFERÊNCIAS

DIMMOCK, JR.; ELIAS, DW.; BEAZELY, M. Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal Chemistry** 6, 1125-1149, 1999.

LEAL, D.; STREHER, C.; BERTONCHELI, C.; CARLI, L.; LEAL, C.; SILVA, J.; MORSCH, V.; SCHETINGER, M. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39 - positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta** 1746: 129-134, 2005.

ZIMMERMANN, H.; MISHRA, S.; SHUKLA, V.; LANGER, D.; GAMPE, K.; GRIMM, I.; DELIC, J.; BRAUN, N. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia** 73: 537-566, 2007.

BOURS, M.; SWENNEN, E.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B.; DAGNELIE, P.. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics** 112: 358-404, 2006.

LEBEAU, J.. Antioxidant properties of di-*tert*-butylhydroxylated flavonoids. **Free radical biology & Medicine** 29, 900-912, 2000.